

Focusing Review

親水性保持係数による HILIC 保持挙動の解析

吉田達成*

Study of HILIC retention behavior using Hydrophilic retention coefficients

Tatsunari Yoshida *

*Analytical Applications Department, Shimadzu Corporation, 380-1, Horiyamashita,**Hadano-city, Kanagawa, 259-1304, Japan**Received for review July 8, 2008. Accepted September 4, 2008.*

Abstract

Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) is able to retain and separate hydrophilic peptides that are not retained on an octadecyl silica column in reversed-phase liquid chromatography (RPLC). It has been reported that separation selectivities in HILIC and RPLC methods differed significantly. In order to clarify the differences of selectivities, a set of “hydrophilicity retention coefficients” in HILIC of peptide is presented. The contribution of each amino acid residue to retention on HILIC column was calculated by linear multiple regression analysis using 121 peptide retention times. A set of the hydrophilicity retention coefficients on each column successfully explained the contribution degree of retention. In this review, recent developments in the separation of peptides by HILIC using polar sorbents and less polar eluents, and the discussion of retention selectivities using hydrophilicity retention coefficients, have been summarized.

Keywords: hydrophilicity retention coefficients, selectivity, hydrophilicity parameters, HILIC, peptide separation

はじめに

逆相液体クロマトグラフィー (RPLC, Reversed Phase Liquid Chromatography) は現在 HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 分析において、約80%の割合で使用されていると言われている。その理由として、(1)RPLC は高分解能であること、(2)移動相に緩衝溶液などと有機溶媒の混合溶液を用いるため、試料が溶解しやすい、(3)HPLC 操作上の観点から取り扱いが容易である、の3点が挙げられる [1]。特に、解析を目的とするペプチドの HPLC においては、水-アセトニトリル (ACN) 混合溶液にイオン対であるトリフルオ

ロ酢酸 (TFA) などを添加した揮発性移動相とオクタデシルシリカ (ODS) カラムを用いる RPLC が、よく用いられている [2]。何故ならば3点の利点に加え更に、分離後に、ペプチドシーケンサーによる配列解析や生理的活性を測定するために、凍結乾燥などで容易に純度の高いペプチドそのものが得られるからである。しかし、この RPLC を持っても、親水性の高いペプチドに対しては、保持されず分析できなかったり、回収率が著しく低下するなどの問題があり、万能では無い。その場合には、イオン交換クロマトグラフィー (IEX, Ion Exchange Chromatography) やサイズ排除クロマト

(株)島津製作所分析計測事業部応用技術部アプリケーション開発センター

神奈川県秦野市堀山下380-1

電話：0463-88-8660

FAX：0463-88-8670

Email :yoshidat@shimadzu.co.jp

グラフィーが用いられるが、これらの方法は分離条件に多量の塩を用いるため、ペプチドを単離する際には、脱塩操作を施さなければならない煩雑さがある [3]。RPLC の利点を持ちながら、RPLC に保持のないペプチドを含む様々な親水性化合物を如何にカラムに保持させ、分離するかに関心が集まっている。

RPLC に保持のない親水性化合物をよく保持し分離する HPLC モードとして、近年、HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) [4, 5] が注目されるようになってきた。これは、有機溶媒 (主に ACN) 濃度 70% 以上で水や緩衝溶液を含む移動相と、シリカゲルそのものやアミノ基など極性基を有する固定相を用いる分離モードで、固定相の極性が移動相のそれよりも高いことが特徴である。HILIC が将来的に有望であると期待されるのは、RPLC に無い選択性を持ちながら、且つ RPLC と同様の揮発性移動相が使用できることから、容易に ESI (ElectroSpray Ionization) - MS (Mass Spectrometer) への接続ができる点にある。HILIC という HPLC 用語は、1990 年、Alpert によって命名された [4]。彼は論文の中で、アスパラギン酸誘導体を官能基に持つ固定相と緩衝溶液 - ACN 系移動相で過塩素酸の濃度を上げてゆく塩グラジエントにより、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、核酸など生体由来の親水性化合物を分離したと報告している。また、彼は HILIC の分離カテゴリーを、variant NPLC (Normal Phase Liquid Chromatography) と説明している。HILIC という用語が提案される以前の 1975 年には、水 - ACN 系移動相とシリカカラムを用いて糖類を分離している手法が、順相液体クロマトグラフィー (NPLC, Normal Phase Liquid Chromatography) として報告されているが [6]、これも HILIC に属するものと考えられ、最近では HILIC として紹介されている [7]。

このように HILIC は広義の NPLC と考えられている [4, 8]。したがって、HILIC での溶質の溶出順序は RPLC の逆になるものと予想される。ペプチドに関して言えば、RPLC に保持されない親水性のペプチドは HILIC に保持され、逆に RPLC に強く保持される疎水性ペプチドは、HILIC には弱く保持される [8]。この選択性の違いは、ペプチドを構成する各アミノ酸残基の固定相に対する保持の強さが、各カラムによって異なるために生じたものと考えられる。HILIC における各のアミノ酸の保持の貢献度は、“親水性保持係数” (Hydrophilicity retention coefficients) と表現され、これは保持の貢献度の定量化に成功し、保持挙動の解明に有用であることが報告されている [9, 10]。RPLC においても、ペプチドを構成する各アミノ酸の保持の貢献度は、疎水性保持係数 (Hydrophobicity retention coefficients) として表現され、同様な考え方で 1980 年代に算出されている [11-15]。この疎水性保持係数は、LogP 値や Rekker の疎水性フラグメント定数 (Hydrophobic fragmental constant) [16] と相関があることも報告されており、RPLC の保持挙動と疎水性

との関係解明にも利用されている [14]。しかしながら HILIC においては、このような親水性保持係数を用い、保持挙動を解析する試みは少ない [9, 10, 17]。本レビューでは、まず、シリカゲル基材を用いている HILIC カラムのペプチドの分離応用例を紹介し、次に主題である HILIC の親水性保持係数を紹介、そして RPLC での疎水性保持係数と対比しながら、その選択性の違いについて定量的な考察を紹介することとする。

1. HILIC によるペプチド分離の応用例

HILIC としての最古の論文は 1952 年の Samuelson らの報告 [18] と考えられている。彼らは固定相にイオン交換樹脂、移動相にエタノールを用いて糖類の分離に成功している。1975 年には、アミノカラム・シリカカラムを用いた水系順相法による糖類の分析 [5] が始まり、現在では食品分野の汎用的な分析法にまで成熟している。1990 年代入ると Alpert の報告に始まり、ペプチド、タンパク質消化物、アミノ酸、核酸といった生体関連物質の分析の報告が主流となった [4, 8]。1990 年後半からは、医薬品分野の分析へと応用され、更に HPLC-ESI-MS での安定した測定が可能になってきたのを機に、さまざまな低分子化合物へ応用されるようになる。今世紀に入ると、様々な種類の官能基を持つ HILIC カラムが開発され、多種の親水性化合物の分離に適用されるようになった [19, 20]。最近では、環境分野にも応用され、農薬の分析にも応用されている。これら HILIC の応用例そして詳細な保持機構の考察は、Hemstron らのレビューにまとめられている [21]。ここでは、シリカゲルを基材とする HILIC カラムを用いたペプチド分離例を紹介することとし [22]、これを表 1 に示した。

HILIC において、分離に関与する溶質と固定相に働く相互作用は、主に水素結合であると考察されているが [8]、他にも双極子相互作用、静電相互作用が関与していることも説明されている [5, 23]。また、HILIC の保持機構は、疎水性な有機溶媒のバルク移動相と固定相上の吸着された水層との間の液-液分配であると一般的に理解されている [4]。

医薬品を代表する低分子極性化合物の HILIC 分析には、未修飾のシリカゲルを固定相とするシリカカラムがよく使用されるのに対し [24-26]、ペプチドの HILIC 分離においては、様々な官能基を有するカラムが使用されている。シリカカラムは、基材上のシラノール基と溶質との間に働く水素結合・静電相互作用によって、HILIC 分離されるものと考えられている [27]。官能基を修飾したカラムにおいては、主に官能基と溶質との間に働く相互作用によって HILIC 分離されるが、更に、基材上のシラノール基によるイオン交換相互作用も HILIC 分離に多大に関与してくることを留意する必要がある。

PolySulfoethyl A [4, 5, 28-30] や NH₂, Polyamine [39], DEAE, CM [20] カラムのようにイオン交換基を有

Table 1 HILIC column for peptide separation

Brand name	Functionality	Mobile phase	Peptides
PolyHydroxyethyl A	Hydroxyethyl aspartamide	Salt gradient in TEAP buffer with ACN	SubstanceP and small peptides [4–5], synthetic model peptides [31], tyrosine protein kinase [32], major tyrosine protein kinase[33]
		ACN gradient, 0.2% H_3PO_4 with ACN	synthetic model peptides [28], polyphenolic protein [34], hydroxyproline-rich glycoprotein [35],
		Isocratic, TEAP buffer with ACN	small peptides [4,5,36], Antistatin (ATS) and recombinant-ATS [37], ovalbumin and GKEGLRFMKGA [38], atosiban1-(3-mercaptopropanoic acid)-2-(O-ethyl D-tyrosine)-4-L-threonine-8-L-ornithine-oxytocine [39]
		ACN gradient, TEAP buffer with ACN	low molecular weight autocrine growth factor [39], vector-mediated peptide [40], diuretic peptides [41]
PolySulfoethyl A	Sulfoethyl aspartamide	Salt gradient, TEAP buffer with ACN	SubstanceP and small peptides [4–5], synthetic model peptides [28–30]
		ACN gradient, TEAP buffer with ACN	synthetic model peptides [28],
TSKgel Amide-80	Amide	ACN gradient, 0.1%TFA with ACN	standard and digest peptides [8], digest and synthetic peptides [8,27]
		ACN gradient, ammonium acetate with ACN	taste-active peptides [42], dipeptide [43], small peptides [20]
ZIC-HILIC	sulfoalkylbetaine	ACN gradient, ammonium formate with ACN	digest peptides [44–46]
Altantis	Underivatized	ACN gradient, ammonium formate with ACN	glycine betaine [47]
Spherisorb NH2	Amino	Isocratic, TEAP buffer with ACN	atosiban1-(3-mercaptopropanoic acid)-2-(O-ethyl D-tyrosine)-4-L-threonine-8-L-ornithine-oxytocine [39]
Polyamine II	Polyamine	Isocratic, ammonium acetate with ACN	atosiban1-(3-mercaptopropanoic acid)-2-(O-ethyl D-tyrosine)-4-L-threonine-8-L-ornithine-oxytocine [39]
SynChropak CM300	Carboxyl	Salt gradient, TEAP buffer with ACN	acetylated core histones [48],
PolyCAT A	Aspartic	Salt gradient, TEAP buffer with ACN	phosphorylated H1histones [49]
TSKgel DEAE-2SW TSKgel CM-2SW	Diethylamino, Carboxyl	ACN gradient, ammonium acetate with ACN	small peptides [20]
TSKgel OH-120 TSKgel Silica-60	Hydroxylic	ACN gradient, 0.2%TFA+0.2%TEA with ACN	digest and synthetic peptides [27]
Lichrosorb Diol	Hydroxylic	ACN gradient, 0.1% TFA with ACN	PeptideT [50]

するような固定相を用いる場合、溶質との間にイオン交換的な相互作用の関与が大きくなると考えられ、さらに違った選択性が得られる。このような分離モードは、HILIC-IEX mixed mode [5, 28–30] として報告されている。但し、イオン交換相互作用の関与が大きくなると、RPLC でもよく観察されるように、ピーク形状が著しく悪くなったり、或いは、溶質が溶出しなくなる問題が生じる。その場合には、移動相のイオン強度を上げるか、緩衝能力の大きなリン酸系移動相を使用するかの方策をとることになる [28]。電荷的にニュートラルであると考えられているアミドカラムや ZIC-HILIC カラムは、イオン交換的な相互作用が少ないと考えられるため、揮発性で低濃度の緩衝溶液と ACN とを組み合わせた緩やかな溶離条件が使用できる。これは ESI-MS への接続を一層容易にしている。しかし、溶質の種類によっては、基

材上のシラノール基とのイオン交換相互作用が強すぎ、ピークがテーリングすることがある。このような場合には、前述のように移動相のイオン強度を上げる他に、TFA などの強い酸を用いると改善されることがあるが [8]、これは ESI-MS には適さない。

3. 親水性保持係数による HILIC 保持挙動の考察

標準ペプチド10種類を HILIC と RPLC で分離したクロマトグラムを図1に示した。AGSE (Peak No. 6) は、RPLC である ODS カラム (Fig. 1 (A)) において、ボイドボリューム付近に溶出し保持されないが、HILIC では、いずれのカラムにおいてもよく保持されている (Fig. 1 (B–D))。RPLC においてあまり強く保持されていない ASTTTNYT (Peak No. 9) のような親水性ペプチドも、HILIC においては強く保持され

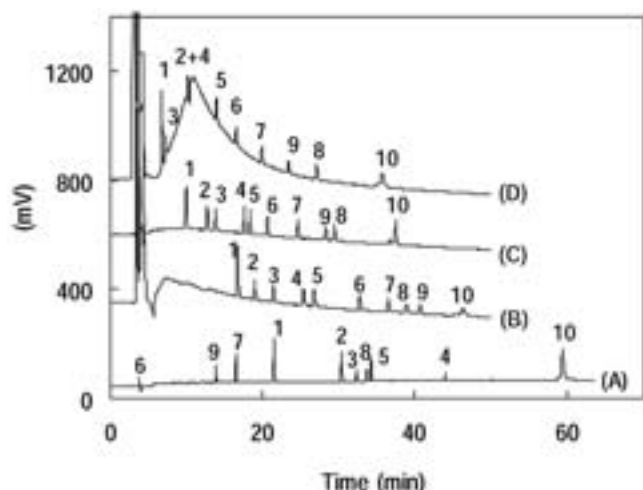


Figure 1

Comparison of chromatograms of peptides separated on (A) TSKgel ODS-80Ts, (B) TSKgel Amide-80 (amide column), (C) TSKgel OH-120 (diol column) and (D) TSKgel Silica-60 (silica column). The peptide mixture was separated with (A) 83.3min linear gradients of acetonitrile from 5 to 55% in 0.1% TFA and (B–D) 70min linear gradients of water from 3 to 45% in 0.2% TFA+0.2% TEA.

Peak identification: 1, FY; 2, FGGF; 3, FLEEI; 4, DYMGWMDP-NH₂; 5, NFTYGGF; 6, AGSE; 7, WAGGDASGE; 8, YGGFMTSQKSQTPLVT; 9, ASTTTNYT; 10, VLSEGEWQLVLHVWAKVEADVAGHGQDILIRLFKSH-PETLEKFDRFKHLKTEAEM*; M*: homoserine

This figure is taken from Ref [27].

ている。一方、RPLCでは強く保持される FLEEI (Peak No. 3) や DYMGWMDP-NH₂ (Peak No. 4) のような疎水性ペプチドは、HILICでは中程度に保持された。アミドカラムにおいて、YGGFMTSQKSQTPLVT (Peak No. 8), ASTTTNYT は、この順に溶出したが、ジオールカラム・シリカカラムでは逆転しており、更に FGGF, FLEEI はアミドカラムでは、この順に溶出したが、シリカカラムでは逆転している [27]。このように HILIC の各カラム間においても、選択性に若干の差がある。このような現象は、ペプチドを構成するアミノ酸側鎖の保持の貢献度が、カラムによって異なっているために生じるものと考えられる [9–10]。シリカ、アミドカラム、ジオールカラムにおけるそれぞれの親水性保持係数を算出し、定量的な選択性の違いを考察する試みがとられた。

RPLC においては、保持時間は構成されるアミノ酸残基の各保持係数の和であることが確認されている [11–15]。この考え方に基づいて、アミノ酸配列が分かっている 121 種類のペプチドをそれぞれの HILIC カラムで分離し、得られた実測の保持時間を式(1)に示す線形式にフィットさせ、各アミノ酸残基の親水性保持係数を算出している [51]。

$$T_{\text{obs}} = \sum_j n_{ij} \times D_j + \text{terminus} \quad (1)$$

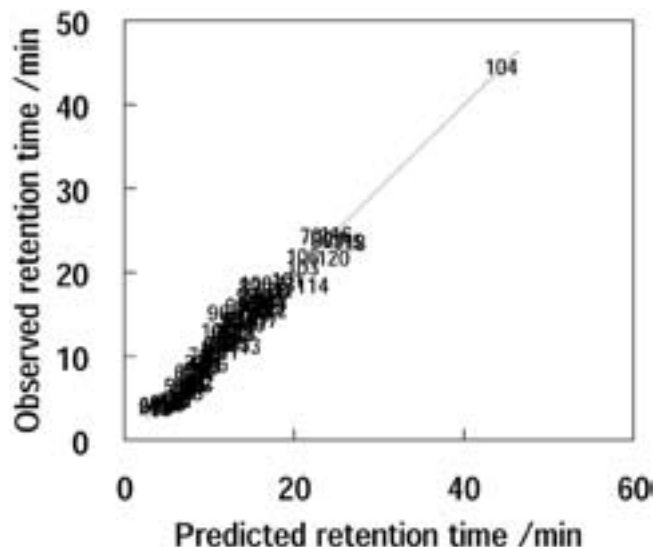


Figure 2

Relationship between observed retention times of peptides and predicted retention times on the silica column based on the hydrophilic retention coefficients by linear regression analysis. The correlation coefficient is 0.98. The each number in Figure is the peptide used as a probe. This figure is taken from Ref [51].

ここで T_{obs} は実測の保持時間、 n_{ij} は i ペプチド中の j アミノ酸残基の数、 D_j は j アミノ酸残基の親水性保持係数、 terminus は i ペプチドの末端係数。

図 2 は、計算された親水性保持係数を用いて、シリカカラムにおけるペプチドの保持時間を予測し、実測値に対しプロットしたものである [51]。図中の数字はペプチドを示している。ペプチドの配列、保持時間については、文献51を参照されたい。これから明らかなように、シリカカラムに関しては、予測値と実測値との間に、良好な直線関係がある。一方、アミド及びジオールカラムについては、式(1)に示す線形式で計算した予測値と実測値との関係が上に凸型のカーブした関係になったと報告されている [9]。このカーブした関係を考慮して、アミド及びジオールカラムに関しては、以下に示すような対数型のモデル式にデータをフィティングさせている [51]。

$$T_{\text{obs}} = A \times \sum_j \log(1 + n_{ij} \times D_j + \text{terminus}) + B \quad (2)$$

ここで T_{obs} は実測の保持時間、 n_{ij} は i ペプチド中の j アミノ酸残基の数、 A , B は係数、 D_j は j アミノ酸の親水性保持係数、 terminus は i ペプチドの末端係数。

計算された親水性保持係数を用いて、アミド及びジオールカラムにおけるペプチドの保持時間を予測し、実測値に対してプロットしたものを図 3, 4 に示している [51]。得られたシリカ、アミド及びジオールカラムの親水性保持係数は、表 2 に示している。更に、各カラムの親水性保持係数を比較

Table 2 Hydrophilicity and hydrophobicity retention coefficients

Amino acid Three-letter code (One-letter code)	Hydrophilicity retention coefficient			Hydrophobicity retention coefficient
	Silica	Amide	Diol	ODS
Ala(A)	0.41	0.21	0.06	0.13
CMC(C)	1.19	0.39	-0.35	1.57
Asp(D)	0.08	1.79	1.15	0.10
Glu(E)	0.10	1.76	0.67	0.27
Phe(F)	-1.27	-2.24	-0.91	1.71
Gly(G)	0.60	0.30	0.29	0.22
His(H)	3.07	3.65	2.59	0.34
Ieu(I)	-0.59	-1.55	-0.55	1.38
Lys(K)	2.56	3.15	3.04	0.05
Leu(L)	-0.84	-2.11	-1.26	1.34
Met(M)	-0.41	-0.85	-1.11	0.85
Asn(N)	1.49	2.24	1.93	-0.45
Pro(P)	1.91	0.67	0.34	0.48
Gln(Q)	2.69	3.08	2.58	0.36
Arg(R)	2.20	3.59	2.15	0.26
Ser(S)	1.22	2.04	2.28	0.18
Thr(T)	0.87	1.23	0.39	0.12
Val(V)	-0.90	-1.46	-0.81	0.38
Trp(W)	-1.80	-1.73	-0.36	2.34
Tyr(Y)	-1.80	-1.04	-0.90	1.23
b value	14.65	8.00	6.61	

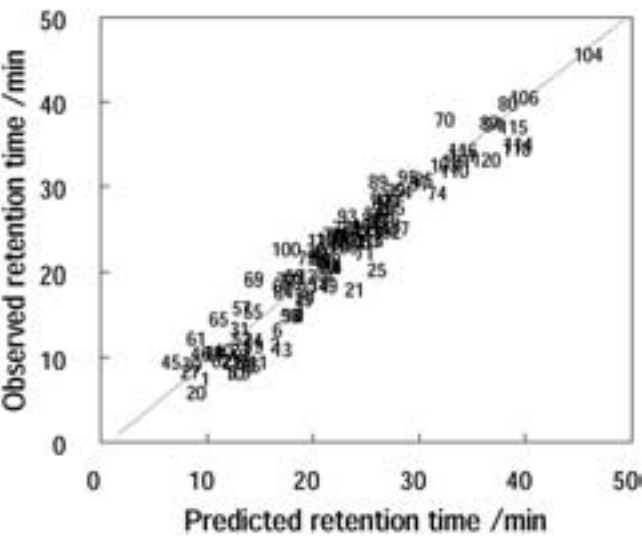


Figure 3

Relationship between observed retention times of peptides and predicted retention times on the amide column based on the hydrophilic retention coefficients by non-linear regression analysis. Constants are $A=24.15$ and $B=-52.36$. The correlation coefficient is 0.96. The each number in Figure is the peptide used as a probe. This figure is taken from Ref [51].

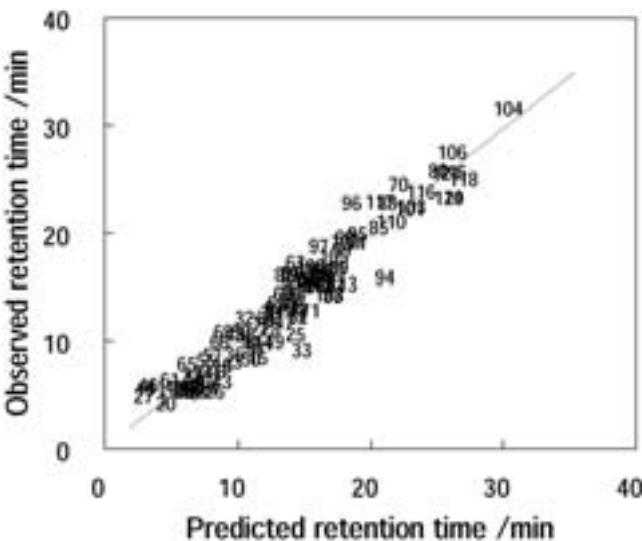


Figure 4

Relationship between observed retention times of peptides and predicted retention times on the diol column based on the hydrophilic retention coefficients by non-linear regression analysis. Constants are $A=15.33$ and $B=-26.38$. The correlation coefficient is 0.96. The each number in Figure is the peptide used as a probe. This figure is taken from Ref [51].

するために、各カラムにおける親水性保持係数で最も大きな値をとるものに+10を、最も小さな正の値を取るものを0に、そして負の値を取るものに-10を割り当て、その間は比例させ、規格化を行った比較図を図5に示している [51]。

図5から、塩基性アミノ酸、アミド基を有するアミノ酸、酸性アミノ酸が保持に大きく貢献しているのが確認できる。その貢献度は、塩基性アミノ酸が一番大きく、次にアミド基を有するアミノ酸、次に酸性アミノ酸及びヒドロキシ基を有するアミノ酸の順であった。Arg, His, Lysの塩基性残基の親水性保持係数は、3種類のカラムにおいてすべて大きな値を示している。使用された溶離条件下で、塩基性アミノ酸は、正の電荷を帯びていると推測され、電荷を帯びたアミノ酸は非常に親水性が高いため、HILICの極性固定相に対してよく保持されるものと考えられる。また、ペプチドはこの正に電荷を通して固定相に保持されているのではなく、塩基性側鎖の持つ親水性によって保持されているものとの報告がある [4]。これら塩基性アミノ酸の中でも、HILICカラムによってその貢献度は異なっている。アミド (3.65) 及びシリカカラム (3.07) においてはHis, ジオールカラム (3.04) においてはLysの保持の貢献度が最も大きい。

アミド基を側鎖に持つAsn, Glnの親水性保持係数も、各HILICカラムにおいて大きな値を示している。これはアミド基の双極子モーメントが大きいことによる、すなわち、極性の大きさに起因するものと推測できる。

次に、酸性アミノ酸であるAsp, Gluが大きな値を示している。使用された溶離条件下 (酸性) では、これらアミノ酸のカルボキシ基はプロトネートしている。カルボキシ基と固定相との水素結合が保持の推進力と考えられる。

ヒドロキシ基を有するThr, Serは、水への溶解度も高く、親水性が高い。これらアミノ酸は、水素結合を通して各固定

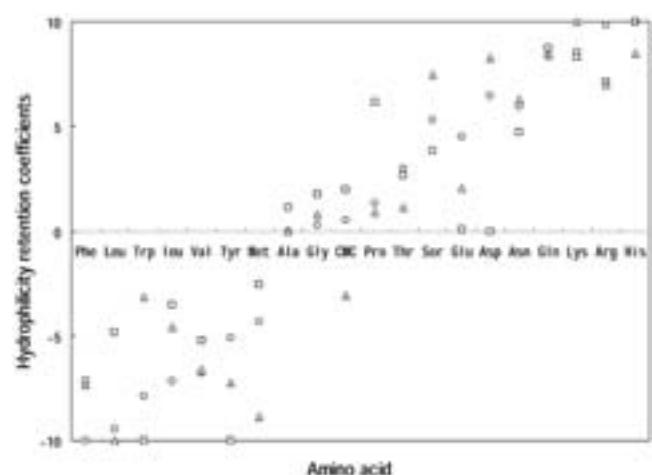


Figure 5

Comparison of the present hydrophilic retention coefficients on each column □ : silica column ; ○ : amide column, △ : diol column

This figure is taken from Ref [51].

相への保持に貢献するものと考えられる。また、ヒドロキシ基の自由度の大きいSerのほうがThrよりも保持に貢献しやすいと予測されている。

Proは疎水的な性質を持つため、本順相法においては保持に貢献しないものと推測されたが、これに反して、すべてのカラムにおいて正の貢献があった。同様にGly, Alaも弱いが疎水性を持っているが、このHILIC分析結果においては、すべてのカラムにおいて正の貢献を与えている。

Trp, Phe, Val, Leu, Ile, Metの疎水性の大きいアミノ酸は、すべてのカラムにおいて保持に負の貢献を示した。これら疎水性アミノ酸は、極性固定相へは保持されにくいと推測できる。またTyrは、親水性を示すヒドロキシ基と疎水性を示すベンゼン環の両方を持つが、HILICに対しては疎水的貢献が大きいとの結果であった。

このように、各HILICカラム間において、若干の選択性の違いが観察されていることは興味深い。親水性保持係数は、それぞれのHILIC固定相における保持の貢献の度合いを定量的に考察でき、保持挙動の解明に役立つことが分かる。ここで紹介した親水性保持係数以外の係数に、Parkerらの報告がある [17]。しかしながら、Parkerらの親水性保持係数はRPLCから算出されているもので、HILICの実質的な保持係数を算出しているとはいいがたい。彼らのパラメータによると、酸性アミノ酸であるAsp, Gluの保持係数の値がもっとも大きく、次にアミド型のAsn, Gln, 次にヒドロキシ基を有するSer, Thr, 次にArg, His, Lysの塩基性アミノ酸の順であった。Trp, Phe, Val, Leu, Ile, Metの疎水性アミノ酸については負の値を取り、保持に貢献していない

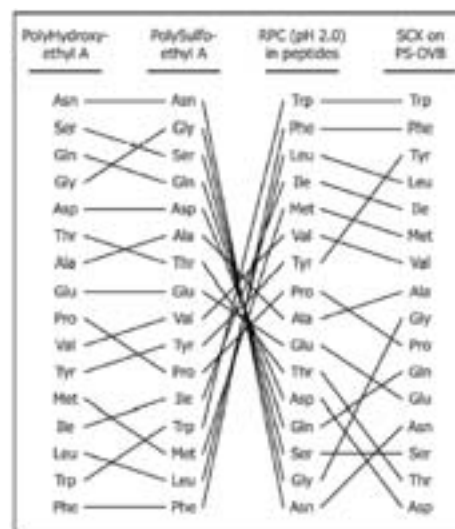


Figure 6

Relative order of elution of amino acids from various column. Tie lines connect the same amino acid. Polyhydroxyethyl A and Polysulphoethyl A: Columns, 200×4.6 mm; mobile phase (isocratic), 10 mM TEAP (pH 2.8) containing 80%v/v ACN. RPC; Linear AB gradient from water to ACN (0.1% TFA in each). SCX; Step gradient of increasing salt and pH. This figure is taken from ref [4].

結果となっている。また、定量的な親水性保持係数は算出されていないものの、Alpert は、PolyHydroxyethyl A カラムと PolySulfoethyl A カラムで得られた16種類のアミノ酸の溶出順序を報告している [4]。これを図6に示した。この結果からは Arg, His, Lys の塩基性アミノ酸に関するデータは無いが、アミド型の Asn やヒドロキシ基を有する Ser, Thr, 酸性アミノ酸である Asp, Glu の保持が大きく、Trp, Phe, Val, Leu, Ile, Met の疎水性アミノ酸の保持は小さいことが分かる。Parker ら、Alpert の報告はいずれも、保持の貢献の大きいアミノ酸の順序は異なるものの、親水性の大きいアミノ酸はよく保持され、疎水性アミノ酸はあまり保持されないという結果は共通している。

4. 親水性保持係数と疎水性保持係数との比較

HILIC と RPLC との選択性の違いを視覚的に考察するために、親水性保持係数 (X 軸) に対して Sasagawa らが報告している疎水性保持係数 (Y 軸) [14] をプロットした。図7にシリカカラムの場合を、図8にアミドカラムの場合を、図9にジオールカラムの場合を示している。疎水性保持係数においては、Trp, Phe, Val, Leu, Ile と行った疎水性アミノ酸は大きな値を示し、Arg, His, Lys, Asn, Gln, Asp, Glu と行った親水性アミノ酸は小さな値を取るが、これは親水性保持係数と逆の関係にある。このように親水性保持係数は、逆相法の疎水性保持係数と概ね逆の関係になっているが、直線的な比例関係があるわけではなく、散らばっている様子が分かる。図5、表2から各 HILIC カラムの間でも選択性の違いがあることを前述したが、この図7-9は視覚的にそれ

を理解することができる。また、図1のクロマトグラムに示したように、これら図7-9の結果から、HILIC での保持と RPLC のそれとが、ただ逆転するだけの関係で無いことを、親水性保持係数と疎水性保持係数の大きさの違いから理解することができる。

このような手法で計算された疎水性及び親水性保持係数は、測定された分析条件において成立し、ユニバーサルなも

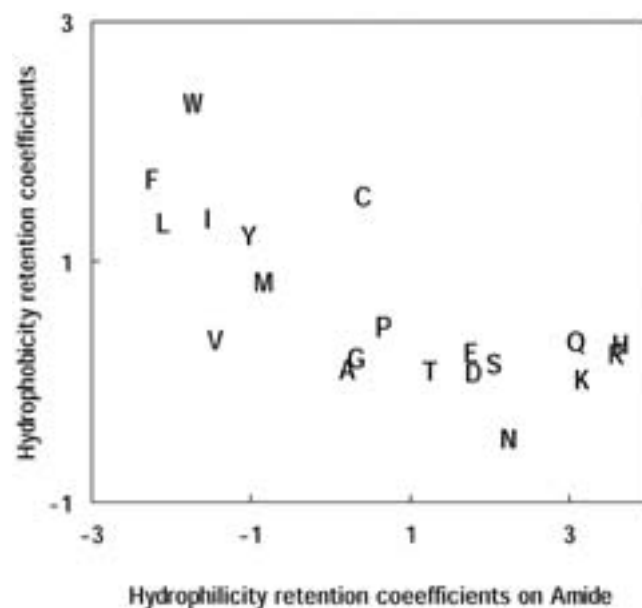


Figure 8

Correlation of the present hydrophilic retention coefficient on the amide column with hydrophobic retention coefficient on ODS. One letter codes are shown in Table 2.

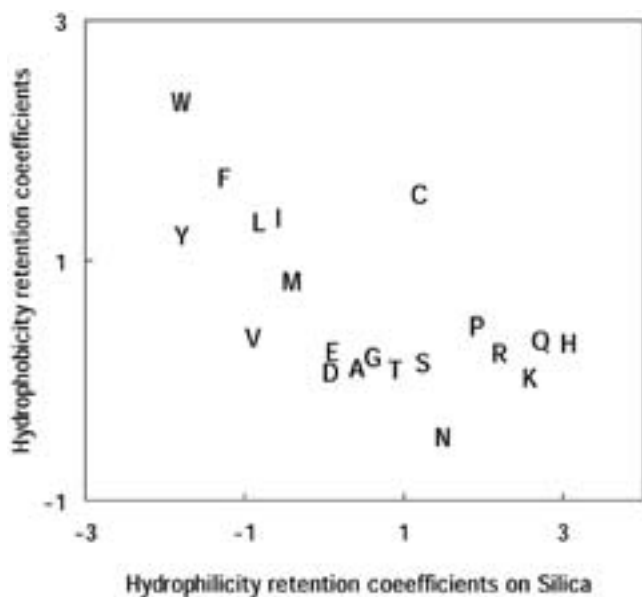


Figure 7

Correlation of the present hydrophilic retention coefficient on the silica column with hydrophobic retention coefficient on ODS. One letter codes are shown in Table 2.

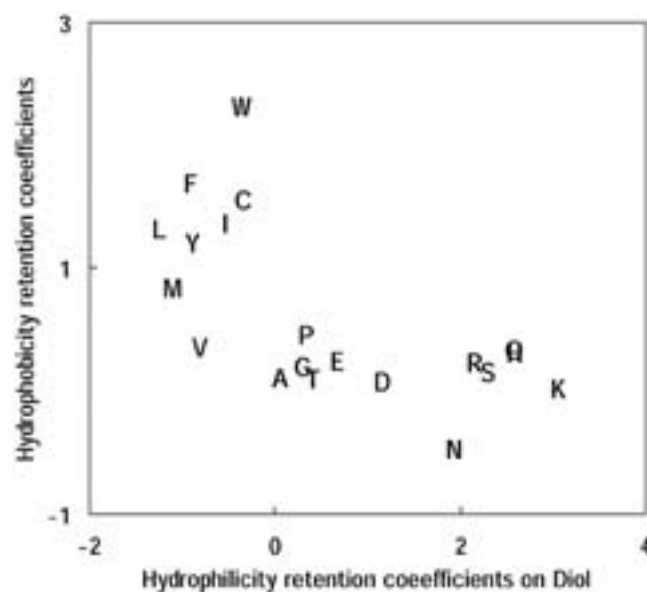


Figure 9

Correlation of the present hydrophilic retention coefficient on the diol column with hydrophobic retention coefficient on ODS. One letter codes are shown in Table 2.

のではない。しかしながら「はじめに」に記したように、RPLCにおいて算出された疎水性保持係数については、物理化学的なパラメーターである LogP 値との相関についても考察されており、RPLC の保持挙動と疎水性との関係解明にも利用されている [14]。親水性保持係数についても、他方で得られた物理化学的なパラメーターと比較・検討され、さらなるその考察が期待される。

5. 今後の HILIC の展望

HILIC と RPLC の溶出順序は概ね逆になると推測できるが、その保持の貢献度を算出し比較することで、定量的にその違いが説明できることを紹介した。これにより選択性の点で、HILIC が RPLC を補完する関係にあることが理解できた。現在、様々な官能基を修飾した HILIC カラムが開発され、その改良も進んでいるが、実際分析してみると、試料の溶解性や保持時間再現性、ピーク形状の歪み、カラムの安定性などの問題に直面することが多い。更に今日、報告されている HILIC カラムは、RPLC カラムの保持力と比較して、全体的に強くない。更なる HILIC カラムの改良・開発が期待されている。近年の HILIC カラムの開発の方向は、RPLC が辿ったように、充てん剤の微粒子化 [52] やモノリス化 [53–54]、超高速・高分離化 [54, 55–57] へと進んでいる。そして、今後期待される多次元 HPLC においては、それを構成する一つのモードとして HILIC が重要な役割を果たすものと期待されている。様々なところで報告されているように、HILIC モードは HPLC 分離において益々重要な分離モードになってゆくと思われる。

References

- [1] L. R. Snyder and J. J. Kirkland Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd ed, John Wiley & Sons: New York, **1979** Chapter 8
- [2] C. T. Mant and R. S. Hodges, HPLC of peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation, CRC Press, Boca Raton, FL, **1991**
- [3] C. T. Mant and R. S. Hodges, *J. Liq. Chromatogr.*, **12** (**1989**) 139
- [4] A. J. Alpert, *J. Chromatogr.* **499** (**1990**) 177–196
- [5] A. J. Alpert, *Anal. Chem.*, **80** (**2008**) 62–76
- [6] J. C. Linden and C. L. Lawhead, *J. Chromatogr.*, **105** (**1975**) 125–133
- [7] S. C. Churms, *J. Chromatogr. A*, **720** (**1996**) 75–91
- [8] T. Yoshida, *Anal. Chem.*, **69** (**1997**) 3038–3043.
- [9] T. Yoshida, *J. Chromatogr. A.*, **811** (**1998**) 61–67
- [10] T. Yoshida, T. Okada, T. Hobo and R. Chiba, *Chromatographia*, **52** (**2000**) 418–424
- [11] J. L. Meek: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, (**1980**) 1632.
- [12] J. L. Meek, Z. L. Rossetti, *J. Chromatogr.*, **211**, (**1980**) 15.
- [13] M. J. O'Hare, E. C. Nice, *J. Chromatogr.*, **171**, (**1979**) 209.
- [14] T. Sasagawa, T. Okuyama, D. C. Teller, *J. Chromatogr.*, **240**, (**1980**) 329.
- [15] C. Chabanet, M.J. Yvon, *J. Chromatogr. A*, **599**, (**1992**) 211.
- [16] R. F. Rekker: "The Hydrophobic Fragment Constant", p 301 (**1977**), (Elsevier, Amsterdam).
- [17] Parker, J. M. R.; Guo, D.; Hodges, R. S. *Biochemistry*, **25** (**1986**), 5425–5432.
- [18] O. Samuelson, E. Sjostrom, *Sevn. Kem. Tidskr.*, **64** (**1952**) 305–314
- [19] M. A. Strege, *J. Chromatogr. B*, **725** (**1999**) 67–78.
- [20] M. A. Strege, S. Stevenson and S. M. Lawrence, *Anal. Chem.*, **72** (**2000**) 4629–4633
- [21] P. Hemstrom, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* **29** (**2006**) 1784–1821.
- [22] T. Yoshida, *J. Biochemical and Biophysical Methods, Review*, **60** (**2004**) 265–280.
- [23] J. Yu and Z. E. Rassi, *Journal of High Resolution Chromatography*, **17** (**1994**) 773–777
- [24] S. Grumbach, D. M. Wagrowski-Diehl, J. R. Mazzeo, B. Alden, P. C. Iraneta, *LC GC North America*, **22** (**2004**) 1010–1023.
- [25] Y. Iwasaki, K. Inoue, R. Ito, Y. Yoshimura, et al., *Bunseki Kagaku*, **54** (**2005**) 135–142.
- [26] H. L. Coh, E. A. J. Lau, E. C. Y. Chan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19** (**2005**) 1237–1244.
- [27] T. Yoshida and T. Okada, *J. Chromatogr. A.*, **840** (**1999**) 1–9
- [28] B. Y. Zhu, C. T. Mant, R. S. Hodges, *J. Chromatogr.*, **594** (**1992**) 75–86
- [29] C. T. Mant, J. R. Litowski, R. S. Hodges, *J. Chromatogr. A*, **816** (**1998**) 65–78
- [30] C. T. Mant, J. R. Litowski, R. S. Hodges, *J. Chromatogr. A*, **816** (**1998**) 79–88
- [31] B. Y. Zhu, C. T. Mant and R. S. Hodges, *J. Chromatogr.*, **548** (**1991**) 13–24
- [32] J. A. Boutin, A. P. Ernould, G. Ferry, J. M. Barret, A. Genton and A. J. Alpert, *J. Chromatogr.*, **583** (**1992**) 137–143
- [33] A. P. Ernould, G. Ferry, J. M. Barret, A. Genton and J. A. Boutin, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **43** (**1994**) 496–504
- [34] S. W. Taylor, J. H. Waite, M. M. Ross, J. Shabanowitz and D. F. Hunt, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (**1994**) 10803–10804
- [35] M. J. Kieliszewski, M. O'Neill, J. Leykam and R. Orlando, *J. Biological Chemistry*, **270** (**1995**) 241–2549
- [36] Ph. Dallet, L. Labat, E. Kummer and J. P. Dubost, *J. Chromatogr. B.*, **742** (**2000**) 447–452
- [37] C. T. Przysiecki, J. G. Joyce, P. M. Keller, H. Z. Markus, C.

- E. Carty, A. Hagopian, M. K. Sardana, C. T. Dunwiddie, R. W. Ellis, W. J. Miller and E. D. Lehman, *Protein Express and purification* 3 (1992) 185–195
- [38] P. Jenö, P. E. Scherer, U. M. Krieg and M. Horst, *Analytical Chemistry* 215 (1993) 292–298
- [39] A. R. Oyler, B. L. Armstrong, J. Y. Cha, M. X. Zhou, Q. Yang, R. I. Robinson, R. Dunphy and D. J. Burinsky, *J. Chromatogr. A.*, 724 (1996) 378–383
- [40] U. Bickel, T. Yoshikawa, E. M. Laudaw, K. F. Faull and W. M. Pardridge, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (1993) 2618–2622
- [41] K. Furuya, K. M. Schegg, H. Wang, D. S. King and D. A. Schooley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (1995) 12323–12327
- [42] H. S. Cerny and M. Affolter, Abstracts of Papers, 222nd ACS National Meeting, Chicago, IL, United States, August 26–30, 2001 (2001), AGFD–073
- [43] V. V. Tolstikov and O. Fiehn, *Analytical Biochemistry*, 301 (2002) 298–307
- [44] P. Hagglund, J. Bunkenborg, F. Elortza, O. N. Jensen, P. Roepstorff, *J. Proteome Res.*, 3 (2004) 556–566.
- [45] Y. Takegawa, K. Deguchi, H. Nakagawa, S.–I. Nishimura, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 6062–6068.
- [46] Y. Takegawa, K. Deguchi, S. Ito, S. Yoshioka, H. Nakagawa, S.–I. Nishimura, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 2097–2106.
- [47] J. Su, R. Hirji, C. He, et. al., *J. Exp. Bot.*, 57 (2006) 1129–1135.
- [48] H. Lindner, B. Sarg, C. Meraner and W. Helliger, *J. Chromatogr. A.*, 743 (1996) 137–144
- [49] H. Lindner, B. Sarg, C. Meraner and W. Helliger, *J. Chromatogr. A.*, 782 (1997) 55–62
- [50] N. N. Arroume, M. Paon, F. Koralewski, A. Freboulet, M. Kouach, G. Briand, Y. Leroy and D. Guillochon, *Enzyme and Microbial Technology*, 26 (2000) 374–380
- [51] T. Yoshida, T. Okada, T. Hobo, *Bunsekikagaku*, 48 (1999) 917–926.
- [52] J. E. McNair, K. C. Lewis, and J. W. Joregenson, *Anal. Chem.*, 69, (1997) 983–989.
- [53] N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, *Anal. Chem.*, 73, (2001) 421A–429A.
- [54] T. Hara, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Nakanishi, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, 78, (2006) 7632–7542.
- [55] T. Yoshida and R. E. Majors, *J. Sep. Sci.*, 29, (2006) 2421–2432
- [56] U. D. Neue and J. R. Mazzeo, *J. Sep. Sci.* 24, (2001) 931–929.
- [57] Cliff Woodward, HPLC 2006, 2006, June18–23, San Francisco, CA. Poster Number P–294–T